

# تهیه و ارزیابی ساختاری داربست نانوکامپوزیتی PHB/nHA مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان

عباس سعادت<sup>۱\*</sup>، علی اصغر بهنام قادر<sup>۲</sup>، سعید کرباسی<sup>۳</sup>، محسن رادمهر<sup>۴</sup>، مرتضی صادقی<sup>۴</sup>، محمد رضا فروغی<sup>۵</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه مهندسی پزشکی، تهران، ایران

۲- گروه بیومواد، پژوهشکده نانوفناوری و مواد پیشرفته، تهران، ایران

پژوهشگاه مواد و انرژی، تهران، صندوق پستی ۴۷۷۷-۱۴۱۵۵۵، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، اصفهان، ایران

۴- دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی، اصفهان، ایران

۵- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف آباد، گروه مهندسی مواد، اصفهان ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۴/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۱۳)

\*a.saadat@srbiau.ac.ir

## چکیده

در این مطالعه ابتدا نانوذرات هیدروکسی آپاتیت ( $nHA$ ) به روش سل - ژل سنتز و سپس داربست نانوکامپوزیتی پلی ۳-هیدروکسی بوتیرات / هیدروکسی آپاتیت ( $PHB/nHA$ ) به روش ریخته گری حلال و انحلال ذره تهیه شد. تهیه داربست ها، با حل کردن  $PHB$  ۰/۴-۰/۸ گرم در ۱۰ cc کلروفرم انجام شد. مقدار ذرات  $nHA$  ۰-۱۰ درصد وزنی نسبت به پلیمر و نسبت  $PHB:NaCl$ ، ۳۰:۷۰، ۲۰:۸۰ و ۱۰:۹۰ انتخاب گردید. به منظور تعیین ساختار پودر  $HA$  سنتز شده و همچنین ساختار داربست ها، تکنیک‌های پراش پرتو ایکس ( $XRD$ )، آنالیز پراش پرتو ایکس بر اساس طول موج ( $EDS$ )، طیف زیرقرمز تبدیل فوریه ( $FTIR$ )، میکروسکوپ الکترونی روبشی ( $SEM$ ) و میکروسکوپ الکترونی عبور نوری ( $TEM$ ) مورد استفاده واقع شد. اندازه ذرات  $HA$  طبق تصویر  $TEM$ ، ۳۰ تا ۴۰ نانومتر و طبق رابطه دبای شرر ۳۵ نانومتر بود. طیف پراش پرتو ایکس پودر هیدروکسی آپاتیت سنتز شده، تشکیل فاز آپاتیت را تایید می کند. طیف زیرقرمز داربست‌های کامپوزیتی ایجاد برهم کنش شیمیایی بین نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و بستر پلیمری را نشان می دهد. که حاصل این برهم کنش افزایش استحکام داربست خواهد بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می دهد که مورفولوژی، اندازه و توزیع حفرات در داربست‌های تهیه شده یکنواخت بوده و اندازه حفرات در محدوده ۲۵۰-۲۰۰  $\mu m$  است. ساختار داربست تهیه شده از محلول ۴ درصد وزنی، یکنواخت تراست. تعداد حفرات باز در سطح داربست، با افزایش مقدار نمک، بیشتر می شود. مقدار تئوری درصد حجمی تخلخل داربست‌های تهیه شده ۸۴-۵۷ برای ۹۰-۷۰ درصد وزنی نمک محاسبه شد که به مقادیر به دست آمده به روش نفوذ حلال بسیار نزدیک است. آزمون آنالیز اشعه ایکس بر حسب طول موج ( $EDS$ ) نشان داد که نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به طور یکنواخت در ساختار داربست توزیع شده است. این مطالعه نشان می دهد که کامپوزیت ( $PHB/nHA$ ) کاندیدای خوبی در مهندسی بافت استخوان می باشد.

## واژه‌های کلیدی:

داربست، مهندسی بافت، پلی هیدروکسی بوتیرات، هیدروکسی آپاتیت، نانوکامپوزیت

## ۱- مقدمه

هدف مهندسی بافت جایگزینی بافت معیوب یا آسیب دیده با جایگزین‌های بیولوژیکی است که بتواند عملکرد طبیعی بافت را به آن بازگرداند و یا حفظ کند. پیشرفت‌های عمده در حوزه جایگزینی عضو و همچنین پیشرفت در علم مهندسی مواد به توسعه دنباله دار علم مهندسی بافت کمک می‌کند [۱].

طی چند دهه گذشته، هدف اصلی مهندسی بافت برطرف کردن محدودیت‌های متداول درمان براساس جایگزین کردن ارگان‌ها و کاشت بیومتریال‌ها می‌باشد [۲-۳]. داربست‌های متخلخل نقش حیاتی در سنتز ماتریس بین سلولی و مولکول‌های بیولوژیکی مربوطه جهت تسهیل تشکیل ارگان دارد [۴-۵]. ویژگی‌های یک داربست در مهندسی بافت استخوان، شامل ساختار داربست، خواص سطحی، خواص مکانیکی و تخریب پذیری می‌باشد. خواص سطحی شامل قابلیت چسبیدن، تمایز و تکثیر سلول است. به علاوه داشتن یک ساختار بسیار متخلخل همراه با یک شبکه حفرات به هم پیوسته برای مهاجرت سلول‌ها و انتقال مواد غذایی و دفع متابولیکی، مورد نیاز است [۵-۶].

ماتریس‌هایی که به عنوان داربست استفاده می‌شود، برای برطرف کردن نیازهای کشت سلول باید خصوصیات زیر را دارا باشد. این داربست‌ها باید طوری طراحی شوند که اجازه نفوذ مواد غذایی به سمت سلول‌های کاشته شده را بدهند و همچنین سلول‌ها را سازمان دهی نمایند و چسبیدن و مهاجرت سلول‌ها را موجب شوند. در این رابطه اندازه حفرات بسیار مهم هستند. خواص مکانیکی داربست باید متناسب با خواص مکانیکی بافت باشد و این خواص در حین ترمیم بافت باقی بماند [۷].

روش‌های متداول ساخت داربست‌های مهندسی بافت شامل ریخته‌گری حلال-انحلال ذره، جدایش فازی، فوم‌سازی با گاز و فریزدرای، قالب‌گیری فشاری و غیره می‌باشد [۸]. مزیت روش ریخته‌گری حلال-انحلال ذره، کنترل درصد تخلخل و مستقل بودن اندازه و شکل حفرات از درصد تخلخل می‌باشد. محدودیت این روش، ارتباط داخلی کم بین حفرات نسبت به

دیگر روش‌ها می‌باشد که با ترکیب آن با روش‌های دیگر می‌توان آن را بهبود بخشید [۸-۹].

استخوان طبیعی مثالی از نانو کامپوزیت است که مرکب از دو فاز عمده آلی و معدنی در مقیاس نانو می‌باشد [۲]. وبستر<sup>۱</sup> و همکارانش نشان دادند که نانو هیدروکسی آپاتیت از طریق افزایش چسبیدن استئوبلاست‌ها به داربست، چسبیدن استئوبلاست‌ها به یکدیگر و مواد معدنی حاوی کلسیم روی سطح داربست، تشکیل بافت استخوانی جدید را افزایش می‌دهند [۱۰]. گروه تحقیقاتی ما<sup>۲</sup> و همکارانش داربستی کامپوزیتی را از پلیمر و ذرات میکرونی هیدروکسی آپاتیت تهیه کردند [۱۰-۱۲]. آن‌ها همچنین اندازه هیدروکسی آپاتیت را در استخوان طبیعی که مقیاس نانو داشت شبیه سازی کردند و نشان دادند که وقتی داربست تخلخل بالا داشته باشد، افزودن نانو هیدروکسی آپاتیت، خواص مکانیکی و جذب پروتئین آن‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۳].

هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات گروه عمده‌ای از بیومتریال‌ها در ترمیم استخوان هستند [۱۴-۱۵]. این مواد به دلیل شباهت ساختاری و شیمیایی با فاز معدنی استخوان طبیعی، خواص استخوان سازی و زیست سازگاری مناسب دارند. به علاوه برهم کنش سلول‌های استخوانی با آن‌ها منجر به قابلیت اتصال خوب به استخوان و تولید مجدد استخوان می‌شود [۱۶]. اما کاربردهای کلینیکی این ترکیبات به دلیل شکنندگی ذاتی و قابلیت شکل‌دهی ضعیف آن‌ها محدود می‌شود [۱۷]. داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک برای ترکیب کردن خاصیت استخوان سازی کلسیم فسفات‌ها و قابلیت شکل پذیری خوب پلی استرها، در مهندسی بافت استخوان توسعه یافته‌اند. این کامپوزیت‌ها زیست‌فعالی و شکل پذیری خوب دارند. این کامپوزیت‌ها همچنین قابلیت کنترل ماکروساختار و ریز ساختار در حین شکل دادن آن‌ها به منظور انطباق با عیوب استخوان را دارا می‌باشند [۱۸-۱۹]. این نانو کامپوزیت‌ها نه تنها به دلیل شباهت ترکیب شیمیایی و ساختاری با استخوان طبیعی بلکه به دلیل عملکرد منحصر به فردشان مانند دارابودن سطح بیشتر و استحکام مکانیکی بهتر نسبت به پلیمر و هیدروکسی آپاتیت به

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

کلسیم نیترات تتراهیدرات، تری اتیل فسفیت، سدیم کلرید و اتانول شرکت Merck مورد استفاده قرار گرفت. اندازه بلورهای نمک سدیم کلرید مورد استفاده در محدوده  $250-212 \mu\text{m}$  بود که این محدوده دانه بندی با الک کردن نمک به دست آمد. پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) از شرکت Aldrich و کلروفورم از شرکت اسپانیائی Scharlau با خلوص ۹۹/۵٪ تهیه گردید.

### ۲-۲- سنتز نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت (nHA)

نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت، به روش سل-ژل و به صورت زیر سنتز شد. کلسیم نیترات تتراهیدرات و تری اتیل فسفیت به ترتیب به عنوان منابع تامین کلسیم و فسفر مورد استفاده قرار گرفتند. محلول یک مولار ترکیبات مذکور در اتانول به طور جداگانه تهیه شد. سپس محلول کلسیم نیترات به صورت قطره قطره به محلول تری اتیل فسفیت اضافه شد. محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $25^\circ\text{C}$  با همزن مغناطیسی هم زده شد و در ادامه مخلوط حاصله برای یکنواخت شدن محصول به مدت چهار روز با شیکر اوربیتالی هم زده شد.

محصول به دست آمده از مرحله فوق در آون در دمای  $80^\circ\text{C}$  خشک گردید. جهت حصول فاز هیدروکسی آپاتیت ماده حاصله به مدت یک ساعت در درجه حرارت  $550^\circ\text{C}$  کلسینه شد که جهت مراحل بعدی از این پودر هیدروکسی آپاتیت استفاده گردید.

### ۲-۳- تهیه داربست پلی هیدروکسی

#### بوتیرات/نانو هیدروکسی آپاتیت (PHB/nHA)

روش تهیه داربست، ریخته گری حلال - انحلال نمک می باشد. برای یافتن غلظت مناسب محلول پلیمری در ریخته گری حلال، غلظت‌های مختلف محلول پلیمری (۴، ۶ و ۸ درصد وزنی) در  $10$  میلی لیتر کلروفورم در درجه حرارت  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  تهیه شد. سپس ذرات هیدروکسی آپاتیت به محلول اضافه گردید و به مدت نیم

تنهایی، به عنوان داربست مهندسی بافت استخوان توسعه یافته‌اند [۲۰].

پلی هیدروکسی آلکانوئئات‌ها (PHAs)<sup>۲</sup> خانواده‌ای از پلیمرها هستند که محدوده‌ای از مواد زیستی مناسب برای مهندسی بافت استخوان را توسعه می‌دهند [۲۱]. پلی هیدروکسی آلکانوئئات‌ها پلی استرهای ترموپلاستیک زیست تخریب پذیر و زیست سازگار هستند که توسط برخی میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند [۲۲-۲۳]. مطالعات زیادی با استفاده از پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB)<sup>۴</sup> و کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات با والرات (PHBV)<sup>۵</sup> به عنوان مواد زیستی برای مطالعات در شرایط مشابه بدن و شرایط بدن مورد استفاده قرار گرفته است [۲۴]. مطالعات زیادی روی زیست سازگاری پلی هیدروکسی بوتیرات و کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات با والرات توسط محققین صورت گرفته است. در خصوص پلی هیدروکسی بوتیرات مشخص شده که سمیت کمی دارد که علت این مسئله تبدیل آن به ۳-هیدروکسی بوتیرات است، که یک جزء طبیعی خون انسان است [۲۵]. پلی هیدروکسی بوتیرات در میکروارگانیسم‌ها همانند یک انرژی داخلی سلولی و ذخیره کننده کربن عمل می‌کند. خواص مختلف مانند طبیعی بودن، زیست تخریب پذیری [۲۶] و زیست سازگاری [۲۷-۲۸] این پلیمر را برای بسیاری از مصارف کاربردی در بدن انسان مناسب می‌سازد [۲۹].

هیدروکسی آپاتیت سنتزی و طبیعی، ترکیب شیمیایی و خواص کریستالوگرافی مشابه استخوان طبیعی انسان دارد [۳۰-۳۱]. زیست سازگاری و قابلیت تحریک به استخوان سازی این ماده برای کاشتنی‌های استخوان مناسب است [۳۲]. مطالعات نشان داده است که افزودن هیدروکسی آپاتیت به مواد زیستی، عملکرد مکانیکی و پاسخ سلولی در برابر سلول‌های استئوبلاست را بهبود می‌بخشد [۳۳-۳۴]. برای اولین بار، در این مطالعه نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت با پلی هیدروکسی بوتیرات مخلوط شده و تاثیر این اختلاط بر ساختار و مورفولوژی داربست مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

محاسبه است.

= درصد حجمی تخلخل

$$\frac{(M/\rho)_{\text{NaCl}}}{[(M/\rho)_{\text{NaCl}} + (M/\rho)_{\text{PHB}}]} \quad (2)$$

#### ۲-۵- مطالعات ساختاری داربست‌های PHB/nHA

مورفولوژی و اندازه حفرات داربست تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد مطالعه قرار گرفت. میکروسکوپ مورد استفاده مدل Philips XL30 ساخت کشور هلند بود. توزیع نانو ذرات در ساختار با تکنیک طیف سنجی اشعه ایکس برحسب طول موج (WDXA) مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۲-۶- مطالعه طیف مادون قرمز نمونه‌ها

جهت بررسی و مطالعه گروه‌های عاملی موجود در داربست‌های ساخته شده از پلیمر خالص و داربست‌های نانوکامپوزیتی و همچنین برهم کنش میان عناصر سازنده نانوکامپوزیت، از تکنیک طیف سنجی مادون قرمز استفاده شد. مدل دستگاه طیف سنج مادون قرمز مورد استفاده در این تحقیق، Jasco FTIR-680 plus ساخت کشور ژاپن می‌باشد.

#### ۲-۷- مطالعه طیف پراش پرتو ایکس

جهت اثبات حضور ذرات nHA در نانوکامپوزیت و نیز به منظور تعیین اندازه‌ی ذرات بلورهای نانوذرات، تکنیک پراش پرتو ایکس استفاده گردید. اندازه بلورهای پلیمر و نانوذره با استفاده از رابطه‌ی دبای شرر مشخص گردید. این رابطه به صورت زیر تعریف می‌شود [۳۶].

$$t = 0.9\lambda / (B \cos\theta) \quad (3)$$

در رابطه (۳)،  $t$  اندازه بلورها،  $\lambda$  طول موج اشعه به کار رفته در آزمون،  $B$  پهنای پیک در نیمه ارتفاع بلندترین پیک و  $\theta$  زاویه‌ای است که بلندترین پیک در آن مشخص شده است. دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس مدل Philips و پرتو  $\alpha$ ،  $k_{\alpha}$  مربوط به مس، با طول موج  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  جهت بررسی و مطالعه بلورهای

ساعت (۳ دوره زمانی ۱۰ دقیقه‌ای) تحت اولتراسونیک حمامی با توان ۳۴۰ W قرار داده شد. درصد نانو ذرات ۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ و ۱۰ نسبت به وزن پلیمر بود. سپس ذرات نمک سدیم کلرید به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه توسط همزن مغناطیسی یکنواخت شد. نسبت نمک به پلیمر ۷۰:۳۰، ۸۰:۲۰ و ۹۰:۱۰ انتخاب شد. مخلوط حاصله داخل پتری دیش<sup>۶</sup> ریخته شد و به مدت دو روز در دمای محیط و سپس یک روز در آون خلا قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. انحلال نمک کامپوزیت‌های تهیه شده با استفاده از شیکر اوربیتالی در آب دیونیزه و به مدت ۵ روز صورت گرفت. سپس به مدت یک روز نمونه‌ها در آون خلا دمای محیط قرار داده شد. نمونه‌ها جهت استفاده به مدت یک روز در دمای محیط قرار داده شد و سپس جهت مراحل مورد استفاده قرار گرفت.

#### ۲-۴- اندازه گیری درصد تخلخل

برای اندازه گیری درصد تخلخل نمونه‌ها آنها به صورت مربع‌هایی به ابعاد یک سانتی‌متر در یک سانتی‌متر برش داده شوند. ضخامت نمونه‌ها با میکرومتر تعیین گردید و حجم ظاهری نمونه‌ها برحسب ابعاد آنها تعیین شد (V). وزن نمونه‌ها با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد ( $W_0$ ). سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در اتانول با خلوص ۹۰٪ و در ادامه به مدت ۱۲ ساعت در آب دیونیزه غوطه ور شدند. وزن نمونه‌ها پس از غوطه وری مجدداً اندازه گیری شد ( $W_1$ ). در نهایت درصد تخلخل طبق رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{درصد تخلخل} = [(W_1 - W_0) / V] \times 100 \quad (1)$$

از هر داربست ۴ نمونه از قسمت‌های مختلف انتخاب گردید و سپس متوسط درصد تخلخل برای هر نمونه مورد محاسبه قرار گرفت (۳۵).

از طرفی درصد حجمی تخلخل را برحسب دانسیته ( $\rho$ ) و جرم مولکولی (M) نمک و پلیمر طبق رابطه زیر به صورت تئوری قابل

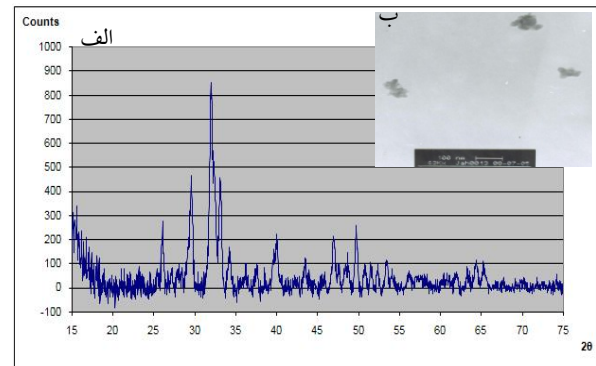
پلیمر و ذرات *nHA* استفاده گردیده است.

### ۳- بحث و نتیجه گیری

#### ۳-۱- نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت

برای اثبات تشکیل هیدروکسی آپاتیت، طیف پراش پرتو ایکس از پودرهای سنتز شده گرفته شد. الگوی پراش پرتو ایکس از پودر سنتز شده در شکل ۱-الف، نشان داده شده است. سه پیک شارب در محدوده  $2\theta = 30-35$  دیده می شود که مربوط به فاز هیدروکسی آپاتیت می باشد.

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری ذرات هیدروکسی آپاتیت نیز در شکل ۱-ب نشان داده شده است. به دلیل سطح ویژه بسیار زیاد ذرات نانو، احتمال آگلومره شدن ذرات نانو بسیار زیاد است. همان طور که در شکل دیده می شود، ذرات تاحدی آگلومره شده ولی اندازه ذرات کمتر از  $100$  نانومتر می باشد.



شکل (۱): (الف) طیف پراش پرتو ایکس و (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نوری (TEM) از ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش سل - ژل.

#### ۳-۲- داربست (PHB/nHA)

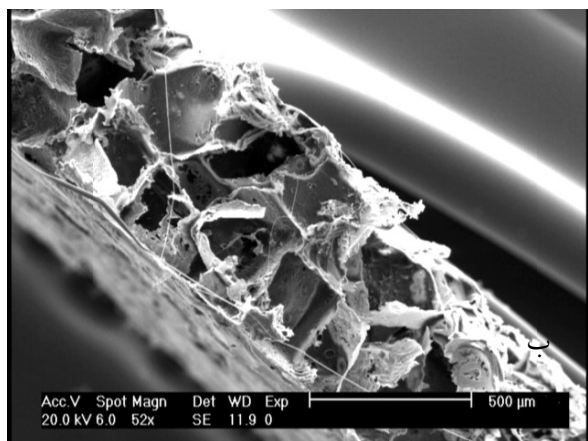
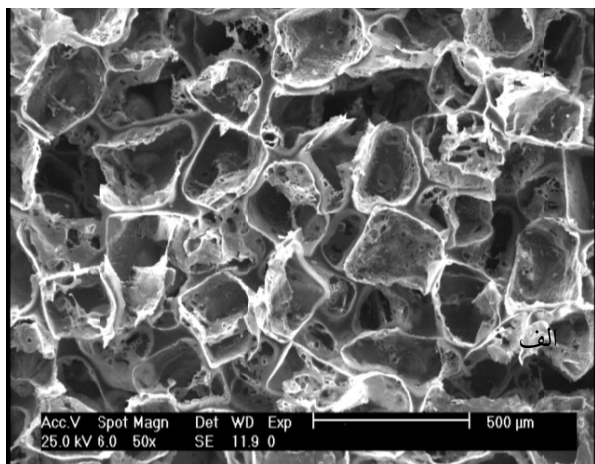
##### ۳-۲-۱- مقادیر درصد حجمی تخلخل

درصد تخلخل در این روش، به میزان نمک مورد استفاده بستگی دارد. با افزایش درصد تخلخل، ارتباط بین حفرات بیشتر خواهد شد. وجود تخلخل بسیار زیاد به همراه وجود ارتباط بین آن ها، برای مهاجرت سلول و انتقال مواد غذایی و دفع متابولیکی مورد نیاز است [۶]. لذا با تغییر میزان نمک، درصد تخلخل بهینه به

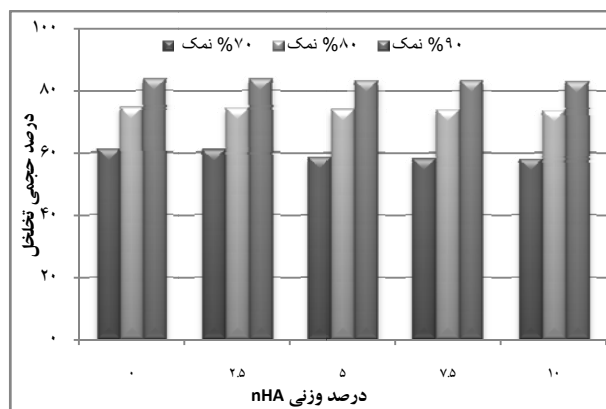
دست خواهد آمد. درصد حجمی تخلخل که به روش نفوذ حلال تعیین شده است، در شکل ۲ آورده شده است. درصد تئوری تخلخل ۵۸، ۷۰ و ۸۴ درصد به ترتیب برای ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد نمک است. همان گونه که در شکل ۲ مشاهده می شود اولاً با افزایش درصد نمک، درصد تخلخل نیز افزایش می یابد که امری طبیعی است. ثانیاً با افزایش مقدار نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت، درصد تخلخل به مقدار ناچیزی کاهش می یابد. این امر ناشی از پر شدن فضای خالی موجود در تخلخل ها توسط نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت است. این موضوع در ساخت داربست های کامپوزیتی یک امتیاز محسوب می شود. زیرا اولاً مطالعات نشان داده است که با افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت در مقیاس میکرونی، تخلخل ها بسته شده و افزودن آن را با محدودیت روبرو می کند. اما در این تحقیق تا ۱۰ درصد نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت به کامپوزیت اضافه شد و تاثیر قابل توجهی بر تخلخل نداشته است. ثانیاً اندازه ذرات نقش مهمی در خواص مکانیکی، زیست فعالی و تخریب داربست های کامپوزیتی دارد. ذرات نانو سطح ویژه بسیار بیشتری نسبت به ذرات میکرونی دارد، لذا خواص زیست فعالی بیشتری را به کامپوزیت می بخشد. از طرفی استفاده از ذرات در مقیاس نانو به استخوان طبیعی بسیار شبیه بوده و این مسئله باعث افزایش استحکام استخوان می شود. پرامانیک<sup>۷</sup> و همکارانش [۳۷] نشان دادند که افزودن نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت به پلی لاکتیک گلیکولیک اسید (PLGA)<sup>۸</sup> استحکام و ضریب الاستیک کامپوزیت را نسبت به ذرات میکرونی بیشتر افزایش می دهد. به علاوه افزودن *nHA* به پلی لاکتیک گلیکولیک اسید ساختار حفرات منظمی را حاصل می کند در حالی که ساختار حفرات پلی ال- لاکتیک اسید (PLLA)<sup>۹</sup> حاوی ذرات هیدروکسی آپاتیت میکرونی، نامنظم می باشد [۳۷].

از بین غلظت‌های مورد مطالعه، غلظت ۴ درصد بهترین ساختار را به دست می‌دهد و به عنوان غلظت بهینه برای تهیه داربست PHB/nHA انتخاب شد.

جهت بررسی نحوه توزیع نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در داخل کامپوزیت، آزمون آنالیز اشعه ایکس برحسب طول موج (EDS) بر مبنای عنصر Ca انجام گرفت که تصویر آن در شکل ۵ آمده است. مطابق شکل ۴ می‌توان گفت که نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به طور یکنواخت در سرتاسر کامپوزیت توزیع شده‌اند.



شکل (۳): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح رویی (الف) و سطح مقطع (ب) داربست‌های تهیه شده از محلول ۴ درصد پلیمر با ۹۰ درصد وزنی نمک.

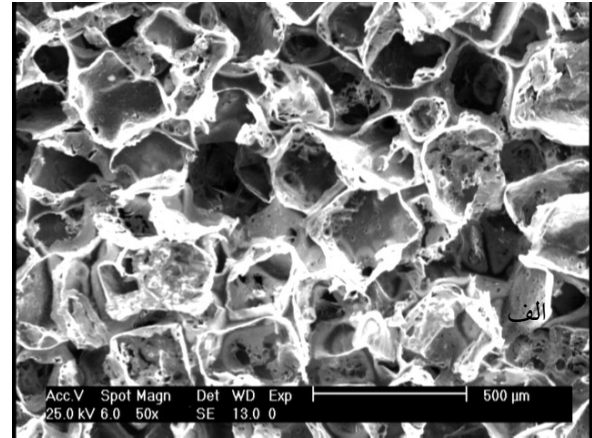
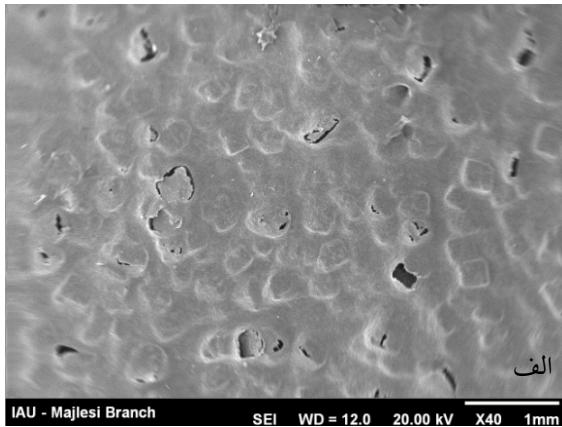


شکل (۲): متوسط درصد حجمی تخلخل محاسبه شده به روش نفوذ حلال برای داربست‌های با ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد وزنی سدیم کلرید و ۰ تا ۱۰ درصد وزنی نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت.

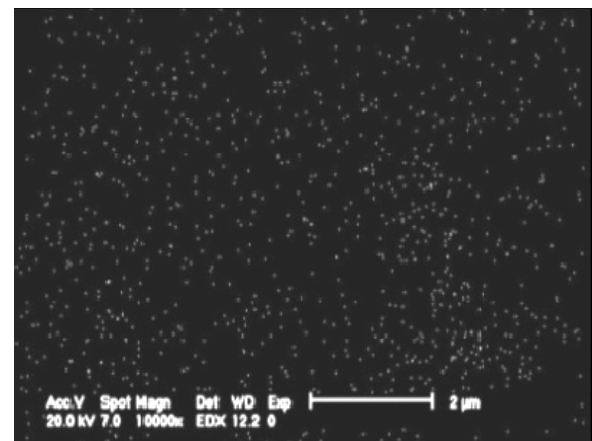
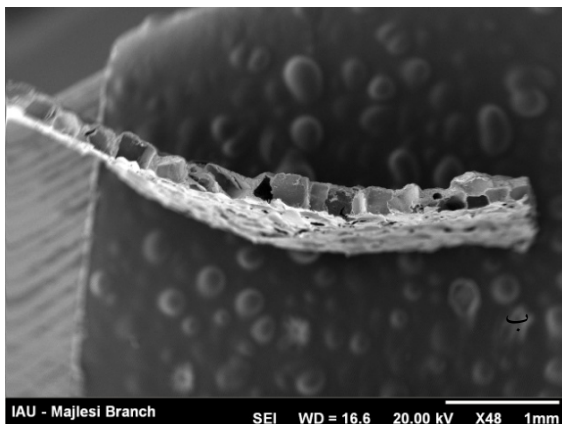
### ۳-۲-۲- اثر غلظت محلول پلیمری بر ساختار داربست

برای تهیه داربست‌ها به روش ریخته گری حلال سه غلظت مختلف محلول پلیمری مورد استفاده قرار گرفت. این سه غلظت ۴، ۶ و ۸ درصد بودند. شکل‌های ۳ و ۴ مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح رویی و مقطع داربست‌های تهیه شده از محلول با غلظت‌های ۴ و ۶ درصد می‌باشد. داربست‌ها با ۹۰ درصد وزنی نمک سدیم کلرید تهیه شدند. همان طور که از تصاویر مخصوصا تصویر مقطع نمونه‌ها مشاهده می‌شود، داربست‌های تهیه شده از محلول ۶ درصد، ساختار یکنواخت و همگنی نداشته و مورفولوژی حفرات به هم ریخته و نامنظم است (شکل ۴). اما در داربست‌های تهیه شده از محلول ۴ درصد، یکنواختی اندازه حفرات و مورفولوژی بهتری مشاهده می‌شود. محلول ۸ درصد نیز بسیار ویسکوز است که این مسئله باعث می‌شود نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و نمک نتواند به خوبی در محلول پراکنده شوند. ضمن اینکه به دلیل ویسکوز بودن محلول، قابلیت ریختن کامل درون پتری دیش را نداشت. لذا نمونه ۸ درصد برای این روش مناسب تشخیص داده نشد. از طرفی غلظت کمتر از ۴ درصد محلول بسیار رقیق حاصل می‌کند که باعث ته نشینی سریع و غیر یکنواخت ذرات نمک در کف پتری دیش می‌شود. در این صورت فیلم حاصله پس از خشک شدن دارای اعوجاج بوده و شرایط مناسبی ندارد. بنابراین

مورد استفاده بستگی دارد. درصدهای نمک مورد استفاده در این تحقیق ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد وزنی می‌باشد. شکل‌های ۶ و ۷ به ترتیب تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به ساختار مقطع و سطح رویی داربست‌های تهیه شده با ۷۰ و ۸۰ درصد وزنی نمک را نشان می‌دهد. تصویر ساختار مقطع و سطح رویی داربست ۹۰ درصد وزنی نمک نیز در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که از تصاویر SEM مشاهده می‌شود، تخلخل‌های مربوط به نمونه‌های ۷۰ و ۸۰ درصد وزنی نمک اکثراً بسته بوده و به نظر می‌رسد برای کشت سلولی مناسب نمی‌باشد. اما نمونه با ۹۰ درصد وزنی نمک دارای تخلخل باز می‌باشد. همچنین وجود حفرات ریز در دیواره داخلی تخلخل‌ها، باعث ارتباط داخلی بهتر بین حفرات می‌شود (شکل ۸). این ارتباط جهت نفوذ سلول‌های کاشته شده به داخل داربست و نیز نفوذ مواد غذایی و دفع مواد حاصل از متابولیسم سلولی مورد نیاز است.



شکل (۴): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح رویی (الف) و سطح مقطع (ب) داربست‌های تهیه شده از محلول ۶ درصد پلیمر با ۹۰ درصد وزنی نمک.



شکل (۵): آنالیز پرتو ایکس برحسب طول موج (EDS) عنصر کلسیم از داربست تهیه شده از محلول ۴ درصد پلیمر با ۹۰ درصد وزنی نمک.

شکل (۶): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح رویی (الف) و مقطع (ب) داربست تهیه شده از داربست با ۷۰ درصد وزنی نمک.

### ۳-۲-۳- اثر درصد نمک بر ساختار

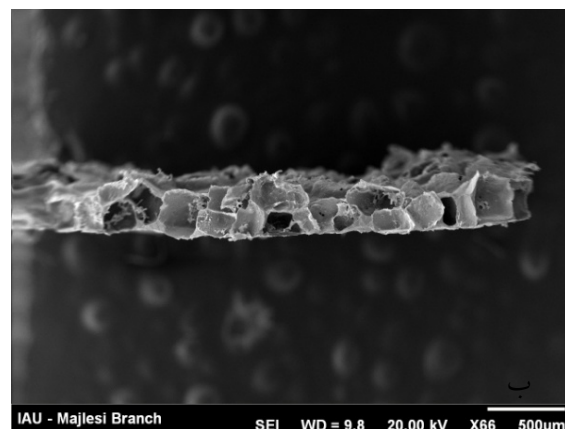
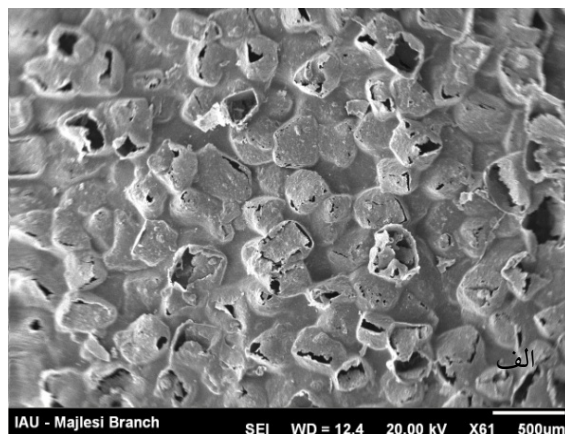
میزان تخلخل داربست در روش انحلال نمک، به میزان نمک

### ۳-۲-۴- نتایج طیف مادون قرمز

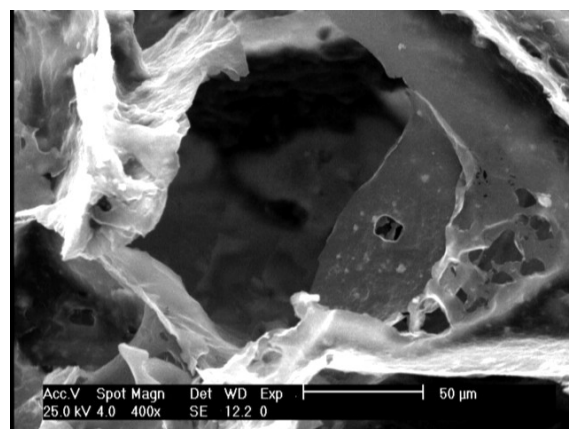
به منظور بررسی گروه‌های عاملی موجود در پلیمر و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و همچنین چگونگی برهم کنش این گروه‌ها با یکدیگر از طیف مادون قرمز آنها استفاده به عمل آمد. به این منظور طیف مادون قرمز پلیمر خالص، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/پلیمر گرفته شد. طیف‌های مادون قرمز مذکور در شکل ۹ به صورت مقایسه ای با هم ارائه شده‌اند.

همان طور که در شکل ۹ ملاحظه می‌شود، طیف مادون قرمز هیدروکسی آپاتیت کلیه پیک‌های مربوط به فاز آپاتیت را به وضوح نشان می‌دهد که در ادامه به توضیح بیشتر این طیف پرداخته می‌شود. پیک مشاهده شده در محدوده  $629-570\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش چرخشی گروه عاملی  $PO_4^{3-}$  و پیک واقع عدد موجی  $1025\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی این گروه عاملی است. پیک پهن ظاهر شده در ناحیه  $357\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه عاملی  $OH$  هیدروکسی آپاتیت است. از آنجا که در سنتز هیدروکسی آپاتیت جهت هیدرولیز تری اتیل فسفیت مقداری آب مقطر به اتانول اضافه شده است و همچنین به دلیل احتمال جذب آب از محیط اطراف، یا پتاسیم برمید مصرفی برای تهیه قرص در ناحیه  $3495\text{ cm}^{-1}$  پیک پهنی ظاهر شده که مربوط به ارتعاشات خمشی گروه هیدروکسیل آب جذب شده است.

در طیف پلیمر،  $PHB$ ، پیک‌های  $1055$  و  $1128$  و  $1176\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند  $C-O$  موجود در این پلیمر است که پیک‌های  $1176$  و  $1128\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن و ارتعاش کششی متقارن پیوند  $C-O$  است. گروه‌های متیل پیک تیزی در  $1375\text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهند که ناشی از ارتعاش کششی این پیوند است. در عدد موجی  $1724\text{ cm}^{-1}$  یک پیک بسیار تیز و واضح مشاهده می‌شود که ناشی از ارتعاش کششی گروه‌های کربونیل می‌باشد.

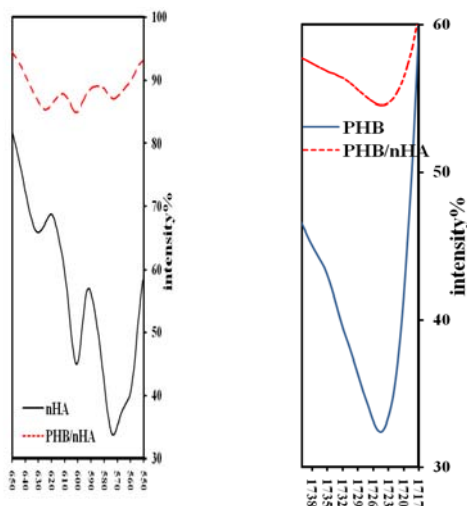


شکل (۷): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح رویی (الف) و مقطع (ب) داربست تهیه شده از داربست با ۸۰ درصد وزنی نمک



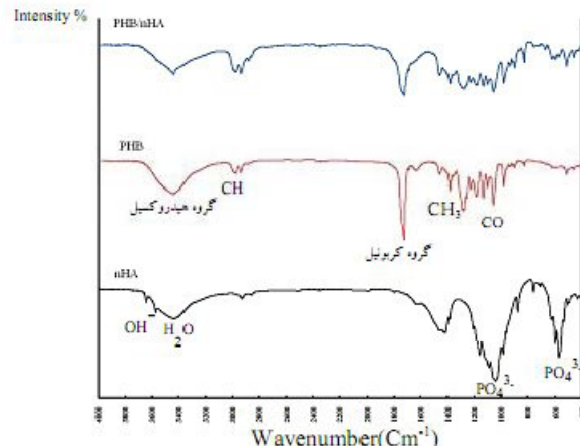
شکل (۸): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از درون یک حفره از داربست با ۹۰ درصد وزنی نمک.





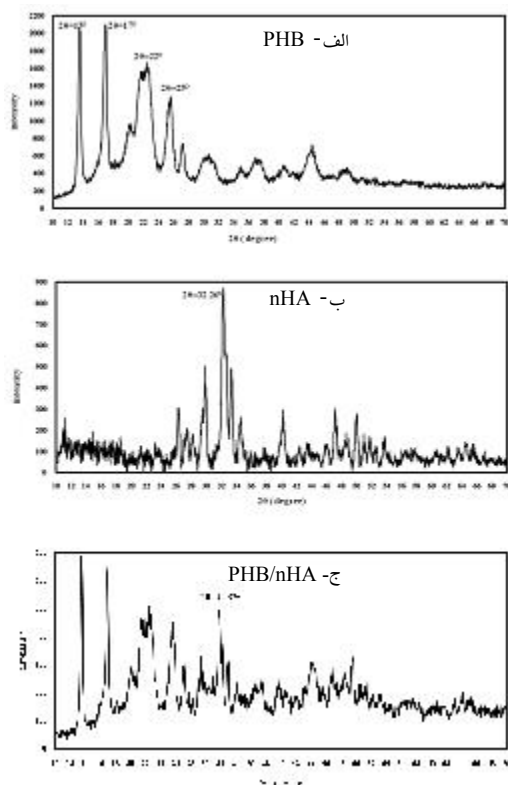
شکل (۱۰): مقایسه طیف مادون قرمز نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و نانو کامپوزیت (راست) و پلیمر و نانو کامپوزیت (چپ).

مقایسه پیک‌های مربوط به مدهای ارتعاشی کششی و چرخشی گروه عاملی فسفات، نشانگر کاهش شدت این پیک‌ها در نانو کامپوزیت نسبت به نانو هیدروکسی آپاتیت خالص است. همان طور که ملاحظه می‌شود مدهای ارتعاشی چرخشی گروه عاملی فسفات به ترتیب از اعداد موجی  $570\text{ cm}^{-1}$ ،  $599\text{ cm}^{-1}$  و  $629\text{ cm}^{-1}$  در نانو هیدروکسی آپاتیت خالص به اعداد موجی  $566\text{ cm}^{-1}$ ،  $596\text{ cm}^{-1}$  و  $620\text{ cm}^{-1}$  در نانو کامپوزیت کاهش یافته است (شکل ۱۰). در مورد پیک ارتعاش کششی گروه عاملی فسفات از عدد موجی  $1025\text{ cm}^{-1}$  در نانو هیدروکسی آپاتیت خالص به اعداد موجی پایین‌تر در نانو کامپوزیت کاهش یافته است، ولی به دلیل تداخل با پیک‌های مربوط به پلیمر در نانو کامپوزیت این کاهش آشکار نیست (شکل ۱۰). این شواهد حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت را اثبات می‌کند و چنانچه گفته شد تغییر اعداد موجی گروه‌های هیدروکسیل و فسفات به اعداد موجی پایین‌تر به علت برقراری پیوندهای هیدروژنی میان گروه‌ها در هیدروکسی آپاتیت و گروه‌های کربونیل پلیمر است.



شکل (۹): طیف مادون قرمز (FTIR) نانوذرات هیدروکسی آپاتیت خالص، پلیمر و نانو کامپوزیت (به ترتیب از پایین به بالا).

پیک مربوط به گروه‌های CH موجود در PHB در نزدیکی  $2900\text{ cm}^{-1}$  مشهود است. PHB دارای گروه‌های انتهایی هیدروکسیل نیز می‌باشد که می‌توان پیک پهن مربوط به این گروه‌ها را در محدوده  $3400-3550\text{ cm}^{-1}$  مشاهده نمود. به منظور بررسی دقیق‌تر برهم کنش هیدروکسی آپاتیت و پلیمر، PHB، طیف مادون قرمز این کامپوزیت در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت در محدوده  $650-550\text{ cm}^{-1}$  بررسی شده است. طیف مادون قرمز کامپوزیت و پلیمر خالص در محدوده عدد موجی  $1740-1717\text{ cm}^{-1}$  در شکل ۱۰ با وضوح بیشتر نشان داده شده است. چنانچه مشهود است پیک جذب گروه کربونیل پلیمر، PHB، خالص در فرکانس  $1724\text{ cm}^{-1}$  به صورت تیزتر و واضح‌تر نسبت به پیک مربوط در نانو کامپوزیت آشکار می‌گردد. در حالی که این پیک در نانو کامپوزیت نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/پلیمر به عدد موجی پایین‌تر  $1721\text{ cm}^{-1}$  انتقال یافته است. انتقال پیک جذب کربونیل به فرکانس‌های پایین‌تر به علت برقراری پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربونیل موجود در پلیمر و هیدروژن‌های هیدروکسی آپاتیت است.



شکل (۱۱): نمودار طیف پراش پرتو ایکس (XRD) برای الف) پلیمر ب) نانوذرات هیدروکسی آپاتیت ج) نانوکامپوزیت.

#### ۴- نتیجه گیری

۱- براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، ساختار داربست‌های ساخته شده با غلظت محلول پلیمری ۴ درصد نسبت به داربست‌های ساخته شده با غلظت محلول پلیمری ۶ درصد از کیفیت بهتری برخوردار می‌باشد.

۲- از طیف مادون قرمز می‌توان ملاحظه کرد که کاهش شدت پیک گروه‌های کربونیل در  $1724 \text{ cm}^{-1}$  و انتقال آن به عدد موجی پایین‌تر  $1721 \text{ cm}^{-1}$  در داربست نانوکامپوزیتی، همچنین کاهش شدت پیک جذب در  $570$ ،  $599$  و  $629 \text{ cm}^{-1}$  و انتقال به فرکانس‌های پایین‌تر  $566$ ،  $596$  و  $620 \text{ cm}^{-1}$  در نانوکامپوزیت گروه فسفات مشاهده می‌شود، که علت برقراری پیوند هیدروژنی میان گروه‌های کربونیل پلیمر و گروه‌های فسفات و هیدروکسید هیدروکسی آپاتیت است.

#### ۳-۲-۵- نتایج طیف‌های پراش پرتو ایکس

برای تأیید تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت و نیز حضور این فاز در نانوکامپوزیت از طیف پراش پرتو ایکس استفاده شد. همچنین با استفاده از رابطه دبای شرر اندازه بلورهای نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت خالص و در درون نانوکامپوزیت محاسبه گردید [۳۸]. نمودارهای طیف‌های پراش پرتو ایکس پلیمر، هیدروکسی آپاتیت و نانوکامپوزیت در شکل ۱۱ ارائه شده است. در نمودار مربوط به پلیمر پیک‌های مشخصه پلیمر در زاویه‌های  $13^\circ$ ،  $17^\circ$ ،  $22^\circ$ ،  $25^\circ$  با شدت بالا ظاهر شده اند. در مورد هیدروکسی آپاتیت پیک واضح و با شدت بالا تقریباً در زاویه  $32^\circ = 2\theta$  درجه نیز مشخص کننده بلورهای هیدروکسی آپاتیت است. پس از ترکیب این دو ماده با یکدیگر و تشکیل نانوکامپوزیت، این پیک‌ها در زاویه‌های قبلی و در کنار یکدیگر ولی با شدت کمتر مشاهده می‌شوند. در مورد nHA خالص با توجه به اینکه  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  و بلندترین پیک در زاویه  $32/26^\circ = 2\theta$  قرار دارد و مقدار پهنای این پیک در وسط آن برابر با  $0.059777 \text{ rad}$  می‌باشد، اندازه ابعاد بلور هیدروکسی آپاتیت خالص طبق رابطه دبای شرر حدوداً برابر با  $24$  نانومتر محاسبه شد. بلندترین پیک در مورد نانوکامپوزیت در زاویه  $31/82^\circ = 2\theta$  مشاهده شد و پهنای این پیک در وسط آن برابر  $0.05585 \text{ rad}$  است. بنابراین مقادیر اندازه ابعاد نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت در نانوکامپوزیت از رابطه دبای شرر حدوداً برابر با  $26$  نانومتر محاسبه گردید. نتایج حاصل بیان‌گر حضور نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت در ابعاد نانومتری در هر دو حالت آزاد و درگیر در کامپوزیت می‌باشد.

۹- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبور نوری، اندازه ذرات هیدروکسی آپاتیت در محدوده ۳۰ تا ۴۰ نانومتر را تایید می کند.

۱۰- تصاویر آنالیز پراش پرتو ایکس براساس طول موج نشان دهنده پراکندگی یکنواخت ذرات هیدروکسی آپاتیت در بستر پلیمری داربست است.

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز پراش پرتو ایکس براساس طول موج، بهترین داربست برای کشت سلول های بافت استخوان، نمونه تهیه شده با غلظت ۴ درصد پلیمر و ۹۰ درصد وزنی نمک است.

## ۵- مراجع

[۱] عنایتی، م. ح.، مواد نانو ساختار، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی

اصفهان، ۱۳۸۶.

- [2] S. Harrison Benjamin, Antony Atala, "Carbone nanotube application for tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 344-353, 2007.
- [3] R. Langer, JP. Vacanti, "Tissue engineering". *Science*, Vol. 260, pp:920-926, 1993.
- [4] F. Kusmanto, G. Gan, Q. Walker, P. Walsh, F. Buchanan, G. Dickson, M. McCaigue, C. Maggs and M. Dring, "Development of composite tissue scaffolds containing naturally sourced microporous hydroxyapatite", *Vol. 139*, pp. 398-407, 2008.
- [5] DW. Hutamacher, T. Schantz, I. Zien, KW. Ng, SH. Teoh, KC. Tan, "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling.", *J Biomed Mater Res*, Vol. 55, pp. 203-216, 2001.
- [6] Y. Chen, AFT. Mak, M. Wang, J. Li, MS. Wong "PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity", *Surf Coat Technol*, Vol. 201, pp. 575-658, 2006.
- [7] E. Nejati, H. Mirzadeh, M. Zandi, " Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(L-Lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering ", *Composites: PartA*, Vol. 39, pp. 1589-1596, 2008.
- [8] SL. Ishaug, GM. Crane, MG. Miller, AW. Yasko, MJ. Yaszemski, AJ. Mikos, "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds", *J Biomed Mater Res*, Vol. 36, pp. 17-28, 1997.
- [9] C. Liu, Z. Xia, J. T. Czernuszka, REVIEW PAPER " Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering" *International Journal of Chemical Engineering research and design*, Vol. 85(A7), pp. 1051-1064, 2007.

۳- طیف پراش پرتو ایکس حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و پلیمر را در نانو کامپوزیت در کنار یکدیگر نشان داد. رابطه دمای شرر همچنین نشان داد که اندازه بلورک های هیدروکسی آپاتیت در حد نانو متری می باشد.

۴- با توجه به دانسیته های مواد موجود در داربست ها، از دیدگاه تئوریک انتظار این است که نمونه های با ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد وزنی نمک به ترتیب دارای حداقل درصد تخلخل ۶۰، ۷۲، ۸۳ باشند. با محاسبه درصد تخلخل به روش نفوذ آب بدون یون درون تخلخل ها برای نمونه های با ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد وزنی نمک، درصد تخلخل به ترتیب ۶۲، ۷۴، ۸۳ به دست آمد، به عبارتی با افزایش درصد وزنی نمک درصد تخلخل کامپوزیت نیز افزایش یافته است.

۵- افزایش درصد وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در نمونه ها تأثیر معنی داری بر درصد تخلخل نانو کامپوزیت ها نشان نداد. به عبارت دیگر با افزایش نانوذرات هیدروکسی آپاتیت تا ۱۰ درصد وزنی، درصد تخلخل برای تمامی نمونه ها کاهش محسوسی پیدا نکرده است.

۶- طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، ابعاد حفرات نانو کامپوزیت ها در محدوده  $250-200 \mu m$  است که با اندازه ذرات نمک مورد استفاده تطابق دارد.

۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه ها پراکندگی یکنواخت تخلخل ها در هر دو سطح رویی و مقطع داربست را در مورد داربست های ساخته شده با ۹۰ درصد وزنی نمک را نشان می دهد و این یکنواختی نسبت به داربست های ساخته شده با ۷۰ و ۸۰ درصد وزنی نمک، بیشتر مشهود است.

۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه ها نشان می دهد که حفره ها روی دیواره داخلی تخلخل ها در هر دو سطح رویی و مقطع داربست های تهیه شده با ۹۰ درصد وزنی نمک نسبت به داربست های تهیه شده با درصد نمک پایین تر، بیشتر است. این امر نشان دهنده ارتباط بهتر بین حفرات داخل داربست های تهیه شده با ۹۰ درصد وزنی نمک است.

- two bioactive degradable composites based on the polyhydroxybutyrate polymer.' , *Biomaterials*, Vol. 13, pp. 491-496,1992.
- [26] G. Turankose, H. Kenar, N. Hasirci, V. Hasirci , "Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) materials for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 1949-1958, 2003.
- [27] E.T. Baran, N. Ozer, V. Hasirci, "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocapsule as enzyme carriers for cancer therapy: an in vivo study." *J Microcapsul*, Vol. 19, pp. 363-373,2002.
- [28] L.J.R. Foster, B.J. Tighe, "Enzymatic assay of hydroxybutyric acid monomer formation in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) degradation studies." *Biomaterials*, Vol. 16, pp. 341-343, 1995.
- [29] C.W. Pouton, S. Akhtar , "Biosynthetic polyhydroxyalkanoate and their potential in drug delivery.", *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. 18, pp. 133-162,1996.
- [30] F. Koosha, R.H. Muller, S.S. Davis, "Polyhydroxybutyrate as a drug carrier." ,*Crit Rev Therap Drug Carr System*, Vol. 6, pp. 117-130,1989.
- [31] M.C. Denis, U. Mahmood , C. Benoist, D. Mathis, R. Weissleder, "Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes." *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 101(34), pp. 12634-12639, 2004.
- [32] H. Jung, M.I. Kettunen, B. Davletov, K.M. Brindle, "Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin.", *J Bioconjugate Chem*, Vol. 15, pp. 983-987, 2004.
- [33] Zhao M, Beauregard DA, Loizou L, Davletov B, Brindle KM., "Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent.", *Nat Med*, Vol. 7(11), pp. 1241-1244, 2001.
- [34] E.A. Schellenberger, F. Reynolds, R. Weissleder, L. Josephson., "Surface functionalized nanoparticle library yields probes for apoptotic cells." *Chem Bio Chem*, Vol. 5, pp. 275-279,2004.
- [35] P.M. Winter, A.M. Morawski, S.D. Caruthers, R.W. Fuhrhop, H.Y. Zhang, T.A. Williams, S. A. Jons, K. L. Elizabeth, J. David Robertson, M. Georgy, A. Samuel, "Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta(3)-integrin-targeted nanoparticles.", *Circulation* , Vol. 108(18), pp. 2270-2274,2003.
- [36] Y. Kuo, and S. Leou, "Effects of composition, solvent, and salt particles on the physicochemical properties of polyglycolide/poly (lactide-co-glycolide) scaffolds", *Biotechnology progress*, vol. 22,101, pp. 1664-1670, 2006.
- [37] K. Superb Misra , Dirk Mohn , J. Brunner Tobias , J. Stark Wendelin, E. Philip Sheryl, Ipsita Roy, Vehid Salih , Jonathan C. Knowles , Aldo R. Boccaccini, " Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass composites", *Biomaterials* Vol. 29, pp. 1750-761, 2008.
- [38] S. Kline, "Describing uncertainties in single sample experiments", *Mechanical Engineering*, vol. 75,105, pp. 3-8 1998.
- [10] Q. Hou, Dirk W. Grijpma, Jan Feijen, "Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique" , *Biomaterials*, Vol. 24 , pp. 1937-1947, 2003.
- [11] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, "enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics " , *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 1803-1810, 2000.
- [12] R. Zhang, P.X. Ma, "poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering I. Preparation and morphology.", *J Biomed Mater Res*, Vol. 44, pp. 446-455,1999.
- [13] P.X. Ma, R. Zhang, "Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix", *Mater Res*, Vol. 46, pp. 60-72,1999.
- [14] P.X. Ma, R. Zhang, " Micro-tubular architecture of biodegradable polymer scaffolds." *J Biomed Mater Res*, Vol. 56, pp. 469-477,2001.
- [15] G. Wei, P.X. Ma , "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 4749-4754, 2004.
- [16] S.H. Li, J.R. De Wijn, P. Layrolle, K. de Groot "Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering" , *J Biomed Mater Res*, Vol. 61, pp. 109-120, 2002.
- [17] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M.C. Blary, P. Hardouin, "Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections- experimental study in the rabbit." *J Mater Sci-Mater Med* , Vol. 12, pp. 679-682,2001.
- [18] S.S. Kim, M.S. Min Sun Park, O. Jeon, C.Y. Choi, B. Kim, "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 1399-1409, 2006.
- [19] F.W. Cooke, "Ceramics in orthopedic surgery." *Clin Orthopedics*, Vol. 267, pp. 135-146,1992.
- [20] R. Zhang, P.X. Ma, "Porous poly(l-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res* , Vol. 45, pp. 285-293, 1999.
- [21] R.C. Thomson, M.J. Yaszemski, J.M. Powers, A.G. Mikos, "Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration." *Biomaterials*, Vol. 19, pp. 1935-1943, 1998.
- [22] R. Murugan, S. Ramakrishna, "Development of nanocomposites for bone grafting.", *Compos Sci Technol*, Vol. 65, pp. 2385-1406, 2005.
- [23] Ya-Wu-Wang, "Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 899-904, 2005.
- [24] C. Kunze, T. Freier, S. Kramer, K.P. Schmits, "Anti-inflammatory prodrugs as plasticizers for biodegradable implant materials based on poly(3-hydroxybutyrate)." *J Mater Sci-Mater M*, Vol. 13, pp. 1051-1055, 2002.
- [25] J.C. Knowles, G.W. Hastings, H. Ohta, S. Niwa, N. Boeree, " Development of a degradable composite for orthopedic use: in vivo biomechanical and histological evaluation of

## ۶- پی نوشت

---

- 1- Webster
- 2- Ma
- 3- Poly Hydroxy alkanooates
- 4- Polly Hydroxy butyrate
- 5- Polly Hydroxy butyrate – Co - Valerat
- 6- Petri dish
- 7- Pramanic
- 8- Poly Lactic –co- Glycolic acid
- 9- Poly L-lactic acid
- 10- Energy Dispersive Spectroscopy